Revista de La Facultad de Medicina, Volumen 21 Número 1, 1998 (35 - 44)

EFECTO DE LA LUZ LASER INFRARROJA PULSADA SOBRE NEOPLASIAS MALIGNAS EN RATONES (BALB-C Y NIH) Y RATAS (SPRAGUE DAWLEY)

D'Alessandro Martínez, Antonio J.*; Sutil Rosas, Aniuska P.**; Selgrad, Stefan***; Hunger, Manfred****; Martin-Landrove, Miguel**** y Pulido, Magdalena*****

Palabras Claves: Láser, Neoplasias Malignas

INTRODUCCION

Esta investigación tiene por objeto determinar el efecto de la radiación láser infrarroja cercana sobre diversos tipos de tumores en ratones Balb-C y NIH y ratas Sprague Dawley.

El termino láser representa las iniciales en ingles de la frase "light amplification by stimulated emission of radiation" y su posibilidad teórica fue planteada por primera vez, por Einstein.[1] Su realización experimental fue posible en 1960, cuando Maiman (1960) publicó la construcción de un láser de rubí (694,3 nm). El término láser se refiere entonces a radiación electromagnética producida mediante un mecanismo muy específico (emisión estimulada) que ocurre en un determinado material. Dicha radiación posee características muy especiales: gran intensidad, direccionalidad y colimación, coherencia óptica y monocromaticidad.[2,3]

Las longitudes de onda de la radiación láser abarcan la región visible del espectro electromagnético (luz), las regiones ultravioleta, infrarrojo y las microondas (Maser). Recientemente, se ha obtenido también el láser de rayos x blandos (100-200Å).[4,5]

La radiación láser tiene diversas aplicaciones en Medicina, entre ellas podemos citar sus aplicaciones quirúrgicas[2] fundamentadas en su efecto térmico y su uso en el tratamiento de diversas disfunciones y neoplasias malignas, debido a su efecto fotoquímico[6] y fotobiológico.[7] El extensivo uso de la luz láser en cirugía[2] se debe a que se puede enfocar, utilizando lentes, espejos o fibras ópticas, en regiones muy pequeñas con suficiente intensidad para cortar y vaporizar los tejidos vivos con extraordinaria rapidez, precisión y poco sangramiento. Aparte de su aplicación en cirugía su uso en terapia comprende diversas modalidades: 1. La aplicación del láser de infrarrojo para tratar disfunciones del músculo esquelético[8], 2. Uso del láser de luz ultravioleta para tratar enfermedades cutáneas[8], como la psoriasis (enfermedad de la piel que se caracteriza por una intensa renovación de las células cutáneas superficiales). En el tratamiento de ésta se utilizan los psoralenos, que tienen la propiedad de

* Cátedra de Fisiología. Escuela de Medicina Luis Razetti. Instituto de Medicina Experimental. Universidad Central de Venezuela / Departamento de Procesos Biológicos. Sección de Biofísica y Bioingeniería. Laboratorio de Biofísica. Universidad Simón Bolívar.
** Pasante de la Facultad de Medicina. Escuela Luis Razetti. Universidad Central de Venezuela.
*** Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" / Instituto de Medicina Experimental.
**** Facultad de Ciencias. Departamento de Física. Universidad Central de Venezuela.
***** Cátedra de Fisiología. Escuela de Medicina Luis Razetti. Instituto de Medicina Experimental. Universidad Central de Venezuela

fijarse al ADN[9] y al ser excitados con luz ultravioleta de 320 a 400 nm de longitud de onda inhiben la síntesis de ADN disminuyendo la velocidad de renovación de las células cutáneas produciendo entonces una mejoría de los síntomas[9] y 3. La aplicación del láser, de diversas longitudes de onda para tratar neoplasias malignas. En este ultimo caso se aplican dos modalidades: la terapia fotodinámica[10] que utiliza al láser como estimulador de un fotosensiblizador, tal como la hematoporfirina y sus derivados[6], que presentan una mayor afinidad por los tejidos cancerosos que por los normales.[9] La combinación del fotosensibilizador, la luz y el oxígeno produce una reacción fotoquímica en los tejidos cancerosos, produciéndose usualmente necrosis de los mismos.[11] La droga parece localizarse preferencialmente en los vasos sanguíneos del tumor mas que en las mismas células tumorales; el mecanismo de la necrosis del tejido parece estar relacionado en parte con la necrosis de los vasos sanguíneos, dicho mecanismo esta mediado por la formación del oxígeno singlete, altamente tóxico, quedando indemnes los tejidos sanos[9], y la laserterapia[12] propiamente dicha que consiste en inducir cambios fotobiológicos en los factores de crecimiento y de necrosis del tumor y/o del sistema inmune, irradiando bien sea a las células tumorales y/o la sangre.

La utilización del láser en el campo de la medicina se debe fundamentalmente al efecto de este sobre el organismo acelerando el tiempo de mitosis, aumentando por ende la renovación de los tejidos, estimulando la producción y actividad de los fibroblastos produciendo un aumento en la cantidad de colágeno y elastina a nivel de la dermis, estimulando la producción de endorfinas (efecto analgésico), estimulando la producción de macrófagos y granulocitos, potenciando la acción inmunitaria, antiinflamatoria y cicatrizante del organismo, creando vasodilatación local, contribuyendo a la reabsorción de los edemas y además regula el equilibrio hidroelectrolítico de los medios intra y extracelular.[8]

Dentro de los láseres de baja potencia encontramos al diodo láser (Arseniuro de Galio dopado con aluminio o silicio), que emite en una longitud de onda entre 810 y 850 (infrarrojo cercano). La profundidad de penetración del rayo puede llegar hasta 2,5-3,5 mm, atravesando perfectamente la epidermis, la dermis y las regiones mas superficiales del tejido subcutáneo sin aumentar la temperatura corporal de la zona tratada, haciéndolo idóneo para el tratamiento de estructuras de localización profunda.

La radiación IR se encuentra en uno de los extremos del espectro visible y se divide en tres regiones espectrales biológicamente significativas:[13] IRA: 780 nm - 1400 nm. IRB: 1400 nm - 3000 nm e IRC: 3000 nm 106 nm. La luz láser infrarroja abarca todo el espectro de la radiación infrarroja.[12]

De acuerdo con van Gemert y Welch[12] los láseres pueden clasificarse en dos categorías: los de onda continua, que producen luz láser sin interrupción, y los pulsados, que liberan pulsos cortos de luz, cuyo rango de duración es desde femtosegundos (10^{-15} s) hasta cientos de microsegundos (μs). Como ejemplos de los primeros están el láser de argón azul-verde (488 nm y 514,5 nm), el láser de CO_2 (infrarrojo, 10.600 nm), el láser de Nd YAG (infrarrojo, 1060 nm y 1320 nm) y el laser de colorante sintonizable.[12]

Entre los láseres pulsados están los de semiconductores (diodo láser) que operan en el infrarrojo cercano (700 nm - 900 nm) y los de colorantes que operan en la banda comprendida entre 200 nm - 900 nm. Existen ademas láseres que operan a longitudes de onda mayores que 900 nm como los de Nd: YAG, Ho:YAG, HF, Er:YAG y CO_2.

Las diversas ventajas de la radiación infrarroja han sido expuestas por Khan:[8] el aumento de la circulación, un efecto sedante sobre las terminaciones nerviosas superficiales, disminución de la presión arterial, aumento de la respiración y de la pérdida de sales, agua, urea y otras sustancias nitrogenadas, y un aumento general de la actividad reticuloendotelial.

Con respecto a la aplicación de las radiaciones en la fisioterapia se han reportado[13] los efectos fisioterapéuticos de la radiación infrarroja: estimulación de los nervios sensoriales y por esta razón se usa para el alivio de espasmos musculares y dolores.

En el caso de edema crónico (exceso de liquido extracelular) de los miembros, la radiación infrarroja puede incrementar la tasa de absorción del exudado como resultado de la vasodilatación y del mejoramiento del drenaje linfático. Esta radiación se usa particularmente en la curación de llagas indolentes, especialmente en las regiones abdominal y perineal.

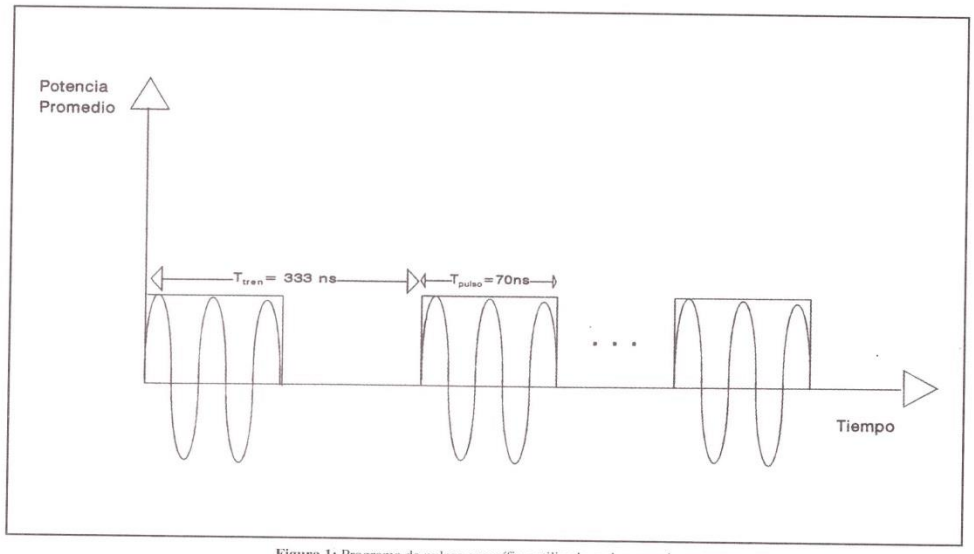


Figura 1: Programa de pulsos específico utilizado en los experimentos.

MATERIALES Y METODOS

La radiación fue generada mediante un diodo que emite pulsos de luz láser infrarrojo HITACHI (HL8312G), constituido por Arseniuro de Galio con impurezas de Aluminio (GaALAs) que opera en un rango de longitudes de onda entre 810 y 850 nm (14,15,16), con una potencia de operación de 20 mVatios en régimen permanente, el tiempo de respuesta del dispositivo es menor a 0,5 ns. La fuente y el programador de pulsos se construyeron bajo la dirección del Dr. Manfred Hunger, en el Lab. de Física Molecular del Dpto. de Física de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela y permite la emisión de trenes de pulsos con frecuencia (f_{tren}) variable de 3, 7, 12 y 13 MHz y una duración del pulso (D_p) variable de 20, 70 y 160 ns. En nuestros experimentos utilizamos un tren de pulsos con una frecuencia de 3 MHz, una longitud de onda promedio de 830 nm y una duración del pulso de 70 ns (Fig. 1). Los animales experimentales y las células neoplásicas fueron suministradas por el Dr. Stefan Selgrad, jefe del Bioterio del Instituto de Medicina Experimental de la Universidad Central de Venezuela e investigador del Instituto Nacional de Higiene.

El trabajo se dividió en tres sedes experimentales distribuidos de la siguiente manera:

SERIE I: Se utilizaron 34 ratas hembras de la cepa Sprague Dawley con un peso aproximado entre 200 y 250 g, las cuales fueron seleccionadas utilizando una tabla de números aleatorios (TNA) para conformar cuatro grupos: GRUPO CONTROL: 8 animales sanos sin irradiación, GRUPO I: 8 animales sanos con irradiación, GRUPO II: 8 animales enfermos sin irradiación y GRUPO III: 10 animales enfermos con irradiación.

El tipo de tumor utilizado fue el tumor de Walker, cuyas células tumorales crecieron previamente en la región intraperitoneal de 2 ratas para luego ser inoculadas en los animales seleccionados. El numero de células tumorales inoculadas por animal fueron aproximadamente 3 millones contenidas en 0,5 ml de líquido ascítico. La vía de inoculación fue subcutánea y el lugar de la misma fue el anca del animal.

La irradiación se realizó en el pabellón de la oreja comenzando dos días después de la inoculación durante un

tiempo de 20 minutos diarios. Los parámetros medidos fueron el hematocrito y el tamaño del tumor cada dos días.

SERIE II: Se utilizaron 20 ratones de la cepa Balb-C hembras y machos, los cuales fueron seleccionados utilizando una TNA para conformar cuatro grupos: GRUPO I: 5 machos enfermos simulados, GRUPO II: 5 hembras enfermas simuladas, GRUPO III: 5 machos enfermos irradiados y GRUPO IV: 5 hembras enfermas irradiadas.

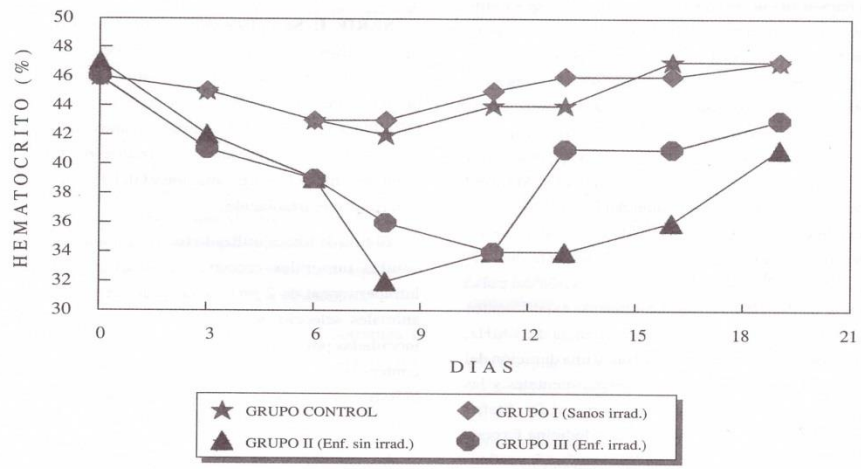
El tipo de tumor utilizado fue el de células de mieloma, inoculándose aproximadamente seis millones en el bazo de cada ratón.

La irradiación se realizó simultáneamente en posición dorsal y ventral, perpendicular al bazo, durante un período de tiempo de 20 minutos diarios (dos sesiones de 10 minutos, mañana y tarde), utilizando un dispositivo de inmovilización. El parámetro medido fue el peso de los ratones.

SERIE III: Se utilizaron 60 ratones hembras de la cepa NIH con un peso que oscilaba entre 16 y 22 g, las cuales fueron seleccionadas utilizando una TNA para conformar cuatro grupos: GRUPO CONTROL: 20 animales sanos, GRUPO I: 10 animales enfermos no simulados, GRUPO II: 10 animales enfermos simulados y GRUPO m: 20 animales enfermos irradiados.

EI tipo de tumor utilizado fue el tumor INHRR-984[17], cuyas células tumorales crecieron previamente en la región intraperitoneal de 5 ratones para luego ser inoculadas en los animales seleccionados. El número de células tumorales que se inocularon por animal fue de 0,5 ml de líquido ascítico tumoral que con aproximadamente tres millones de células neoplásicas. La vía de inoculación fue subcutánea y el lugar de la misma fue la grupa del animal. La irradiación se realizó en las venas caudales 1 vez al día durante 20 minutos diarios. El proceso de simulación y de irradiación se efectuó simultá-

Fig. 2 HEMATOCRITO VS TIEMPO SERIE I



neamente 36 horas después de la inoculación. Los parámetros medidos fueron el peso, el hematocrito, el volumen del tumor y la sobrevivencia de cada uno de los grupos en estudio.

Los resultados de cada serie experimental fueron analizados utilizando el test de Student (t).

Tabla 1
Velocidad de ascenso del hematocrito promedio de los grupos estudiados en la SERIE I

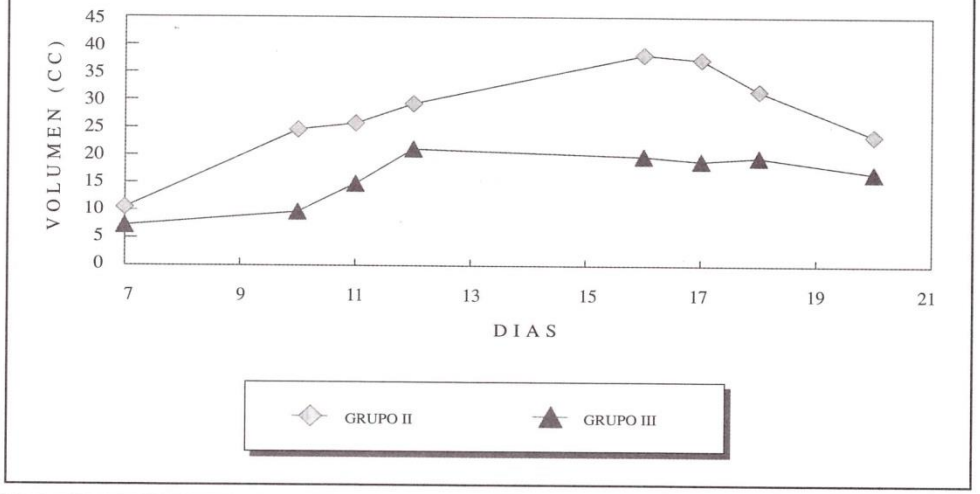
GRUPOS	VELOCIDAD DE ASCENSO
CONTROL	0,45
I	0,36
II	0,81
III	1,12

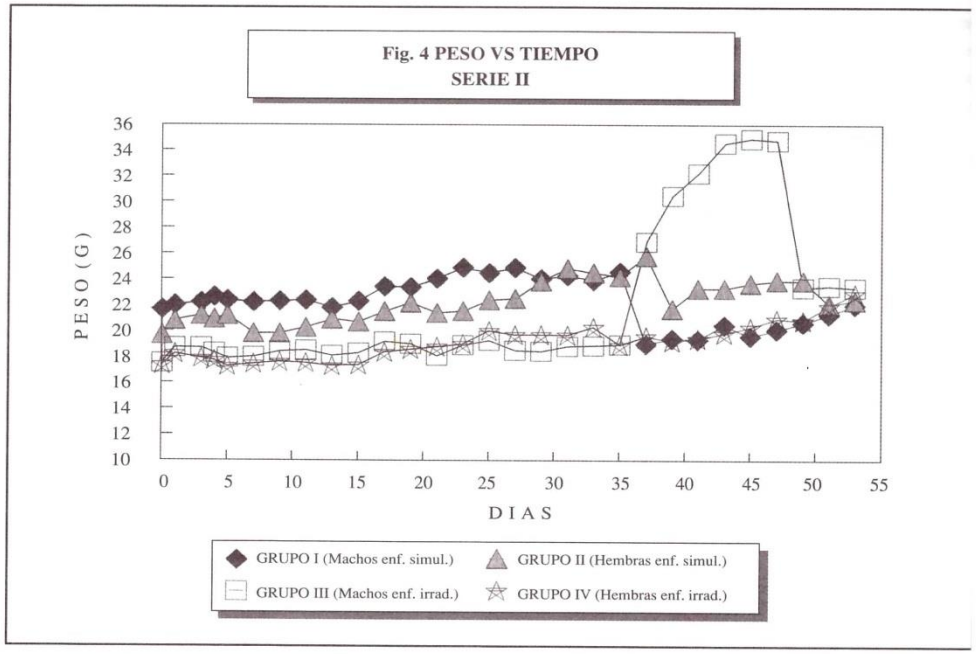
RESULTADOS Y DISCUSION

SERIE I: El estudio estadístico utilizado demostró que la radiación láser infrarroja no produce un efecto significativo sobre el hematocrito del grupo control y el grupo I (p= >0,8) y entre el grupo II y el grupo m (p= 0,1852), pero existe una diferencia estadísticamente significativa (p= 0,0077) entre el grupo II y el grupo III en el volumen del tumor. Se evidencia de esta manera que la radiación láser ejerce un efecto de remisión sobre el tamaño de este tipo de tumor en los animales enfermos irradiados (grupo III).

Al observar el comportamiento de las cifras de hematocrito de los grupos estudiados (Fig. 2) se puede inferìr que existe un aparente ciclo biológico del mismo en los cuatro grupos de experimentación, que consiste en una disminución de sus valores a partir del primer día de medición y hacia el día octavo, en el caso de los grupos control, I y II presenta un valor mínimo. El decremento con respecto al valor inicial es de 4%, 3% y 15%, respectivamente. En el caso del grupo III

Fig. 3 VOLUMEN DEL TUMOR VS TIEMPO SERIE I



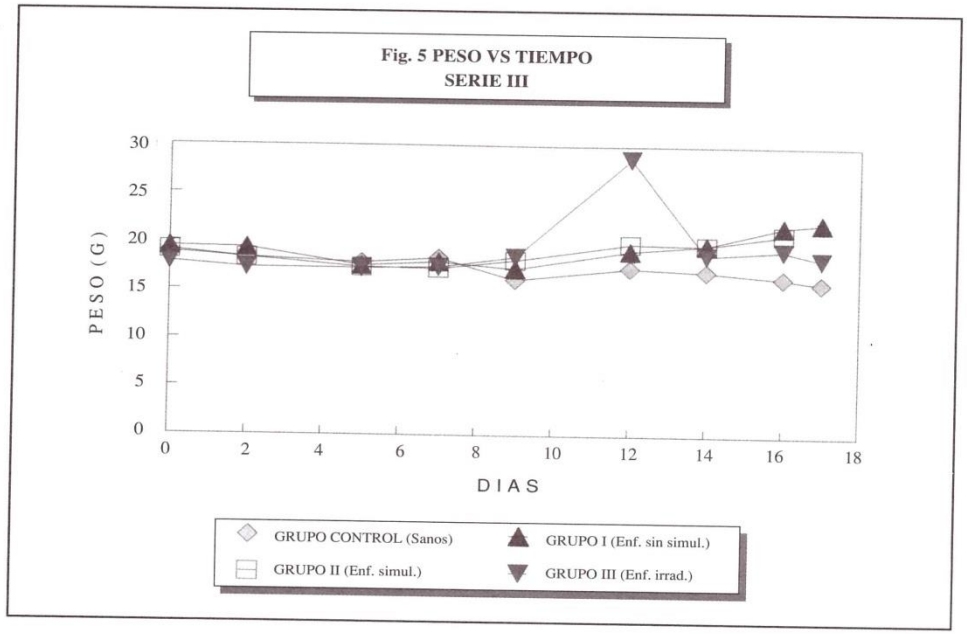


el valor mínimo de hematocrito se alcanza el día onceavo de medición con un decremento del 12%, en este caso el valor mínimo del hematocrito (34%) es mas alto que el del grupo II. Estos valores se incrementan a partir del mínimo, con tendencia a volver a sus valores iniciales.

La evaluación de la velocidad de ascenso del hematocrito (ver tabla I) respecto al valor mínimo en los dos grupos de animales enfermos (grupos II y III), nos permite inferir que los animales que recibieron radiación láser presentan una recuperación del hematocrito mas rápida (1,12 % / día) que el grupo de animales que no recibió la irradiación (0,81% / día). Los valores obtenidos para la velocidad de ascenso del hematocrito en los grupos de animales sanos fueron 0,45 % / día y 0,36 % / día para el grupo control y el grupo I respectivamente; sin embargo la diferencia entre estos dos valores esta dentro del error de la velocidad de ascenso que es de 0,27 % / día.

Al analizar la dinámica del crecimiento tumoral (volumen vs tiempo) (Fig. 3) se observa que en el séptimo día de la irradiación el volumen del tumor del grupo de animales no irradiados fue de 10,5 cm^3, mientras que el volumen del tumor en los animales irradiados fue de 7,2 cm^3. Para el grupo sin irradiar (grupo II) el volumen del tumor alcanzó su máximo en el día 16 con un valor de 38,1 cm^3. y para el grupo irradiado (grupo III) el máximo se alcanzo en el día 12 con un valor de 28,4 cm^3 . En este ultimo grupo el volumen del tumor presenta una meseta entre los días 12 y 20 con un valor promedio aproximado de 19,8 cm^3. Entre los días 12 y 20 el grupo no irradiado presenta una fase de crecimiento seguida de otra de decrecimiento. De acuerdo con estos resultados podemos concluir que la radiación láser infrarroja cercana pulsada tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento del tumor durante todo el experimento. El efecto inhibitorio quizás ocurra por una competencia entre los factores de crecimiento del tumor y factores de necrosis del tumor estimulados por la radiación láser; o bien, esta radiación inhibe directamente los factores de crecimiento del tumor.

SERIE II: El test de Student no arrojo diferencias significativas entre el peso promedio del grupo I y el grupo



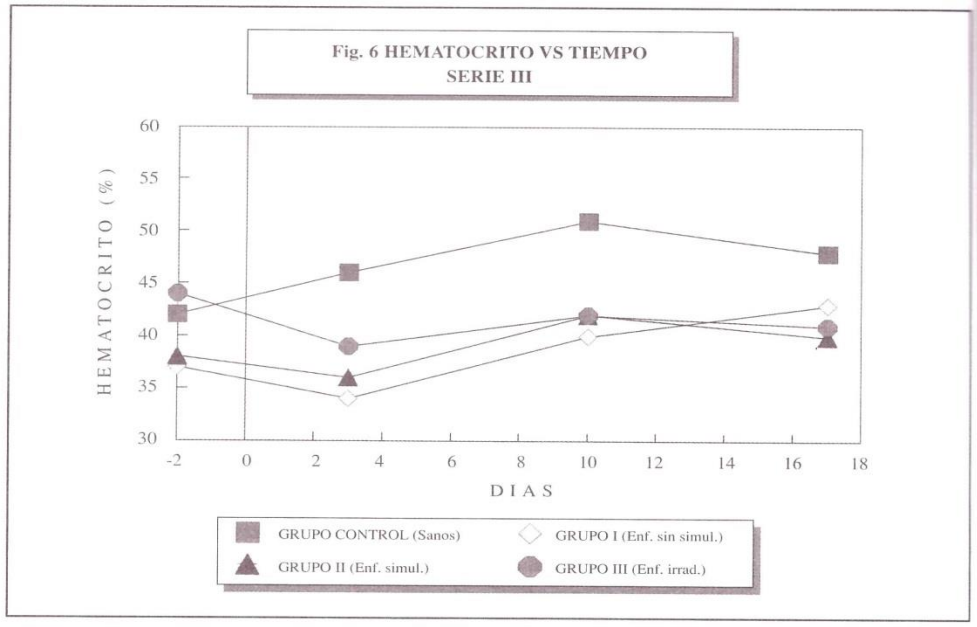
II (p= 0,08), y entre el grupo III y el grupo IV tampoco existen diferencias significativas (p= 0,3204) (Fig. 4). De esta manera puede concluirse que la radiación láser infrarroja no afecta el peso de los ratones machos ni el peso de los ratones hembras.

SERIE III: Al comparar el peso promedio (Fig. 5) del grupo control y del grupo I se obtuvo un valor de p=0,0087, demostrándose de esta manera que existen diferencias estadísticamente significativas en el peso de ambos grupos. Al comparar el peso promedio del grupo I y el grupo II, se obtuvo un valor de p=0,3095 y entre el grupo II y el grupo III el valor de p >0,8.

El hecho de que no existan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo I y II nos indica que el estrés al cual se someten los ratones durante el proceso de irradiación no ejerce ninguna influencia estadística sobre el peso promedio de los ratones. El resultado obtenido al comparar los grupos II y III, nos demuestra que la radiación láser infrarroja no ejerce un efecto estadístico sobre el peso promedio del tumor estudiado.

Con respecto a la comparación del hematocrito promedio (Fig. 6) entre el grupo control y el grupo I el valor de p= 0,0225, habiendo entonces una diferencia estadísticamente significativa en el hematocrito promedio de ambos grupos. Al comparar el grupo I y el grupo II el valor de p >0,8 y entre el grupo II y III p= 0,1824. Estos resultados implican que la radiación láser infrarroja utilizada no ejerce una influencia estadísticamente significativa en el hematocrito promedio de estos grupos, lo cual se corresponde con el resultado obtenido en el caso del peso promedio.

La evaluación estadística de la sobrevivencia (Fig.7) indica que entre el grupo control y el grupo III existe una diferencia estadísticamente significativa (p= 0,03). La sobrevivencia del grupo III es siempre menor que la del grupo control. Por otra parte, la sobrevivencia del grupo III es mayor (0,47) que la sobrevivencia del grupo II (0,25) y el



grupo I (0,22) entre el día 7 y el día 16. Estos resultados nos permiten concluir que la irradiación con luz láser infrarroja en los días mencionados produce una inhibición tumoral, que no se manifiesta cuando se estudia la evolución temporal del hematocrito entre los mismos grupos.

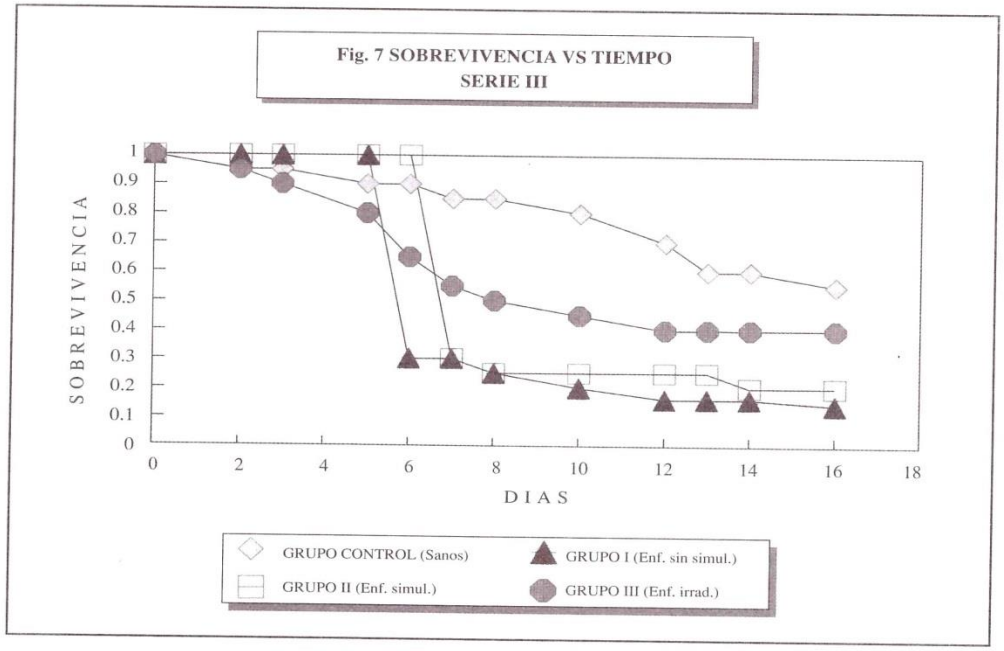
La evaluación estadística del contaje leucocitario, determino que no existen diferencias significativas al comparar el grupo control con el grupo I (p= 0,085), el grupo I con el grupo II (p= 0,72) y el grupo II con el grupo III (p= 0,68). Pudiendo concluir entonces, que ni la presencia del tumor ni la influencia de la radiación laser IR afecta estadísticamente el contaje leucocitario de los animales estudiados.

CONCLUSIONES

Hasta la fecha se han realizado diversos estudios para determinar los mecanismos de acción de la radiación electromagnética, ionizante[18] y no ionizante[19,20], en cultivos celulares, en tumores y organismos. En el caso de las radiaciones no ionizantes el efecto de la radiación visible, infrarroja y ultravioleta ha sido objeto de muchas investigaciones, en ellas se ha utilizado la radiación coherente (láser) y no coherente.

En esta investigación los efectos de la radiación láser infrarroja pulsada se pueden dividir dependiendo del tipo de animal estudiado (ratones o ratas) y del tipo de tumor.

En la serie I donde se utilizaron ratas hembras de la cepa Sprague Dawley y el tipo de tumor fue el de Walker se evidenció que la radiación láser infrarroja ejerce un efecto sobre el hematocrito de los animales enfermos, pudiéndose inferir que cuando el animal está enfermo se producen factores tumorales y/o sanguíneos sobre los cuales la luz láser induce cambios que se traducen finalmente en una reducción del hematocrito, ademas ejerce un efecto de remisión sobre el tamaño del tumor en los animales enfermos irradiados durante todo el experimento.



En la serie II donde se utilizaron ratones de la cepa Balb-C y el tipo de tumor fue el de células de mieloma, se demostró que la radiación láser infrarroja no ejerce un efecto estadísticamente significativo sobre el peso de los animales estudiados.

En la serie III se utilizaron ratones de la cepa NIH y el tipo de tumor fue el INHRR984. Aquí se evidenció la influencia de la radiación láser sobre la sobrevivencia la cual fue mayor en los animales enfermos irradiados que en aquellos enfermos no irradiados. Así, podemos concluir, en este caso, que la radiación láser permite que se prolongue la vida del animal enfermo hasta el final del experimento.

RESUMEN

Esta investigación tiene por objeto determinar el efecto de la radiación láser pulsada infrarroja cercana (830 nm) sobre los tumores de Walker (serie I) en ratas Sprague Dawley, mieloma (serie II) y INHRR-984 (serie III) en ratones Balb-C y NIH, respectivamente. El trabajo se dividió en tres series experimentales que permitieron determinar el efecto de la radiación utilizada sobre los diversos tipos de tumores. Los datos obtenidos en cada serie experimental fueron analizados utilizando el test de Student (t). Estos resultados fueron los siguientes: en la serie I la luz láser ejerce un efecto de remisión sobre el tamaño del tumor en los animales enfermos irradiados y produce una reducción transitoria del hematocrito debida quizás a su influencia sobre los factores tumorales y/o sanguíneos; en la serie II la radiación utilizada no afecta el peso de los ratones Balb-C inoculados con el tumor de células de mieloma y en la serie III se demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas al comparar el peso ni el hematocrito promedio de los grupos estudiados. Sin embargo, en esta misma serie la sobrevivencia de los animales enfermos irradiados fue mayor que en aquellos enfermos no irradiados.

FE DE ERRATAS

El Comité Editorial de la Revista de la Facultad de Medicina hace la siguiente aclaratoria en el trabajo "Efecto de la Luz Laser Infrarroja pulsada sobre Neoplasias Malignas en ratones" publicado en nuestra revista, Vol. 21, Enero-Junio, Nº 1, 1998 por D'alessandro y Cols.:

Página 40: (párrafo 3)
Donde dice: un valor de 28,4 cm^3
Debe decir: un valor de 20,4 cm^3

Página 40:
Donde dice: SERIE II: El test de Student no arrojó diferencias significativas entre el peso promedio del grupo I y el grupo II (p=0,08), y entre el grupo III y el grupo IV tampoco existen diferencias significativas (p=0,3204).
Debe Decir: SERIE II: El test de Student no arrojó diferencias significativas entre el peso promedio del grupo I y el grupo III (p=0,08), y entre el grupo II y el grupo IV tampoco existen diferencias significativas (p=0,3204).

Página 42: Conclusiones (párrafo 5)
Donde dice: reducción del hematocrito
Debe decir: aumento de la velocidad de ascenso del hematocrito.

Página 43: Resumen (párrafo 4)
Donde dice: reducción transitoria del hematocrito
Debe decir: aumento en la velocidad de ascenso del hematocrito.

Página 44: Abstract
Donde dice: transient hematocrit reduction
Debe decir: aument in hematocrit's ascent velocity